

Du pollen à l'ovule ou le difficile parcours du tube pollinique

Les recherches fondamentales sur la fécondation des angiospermes sont rares chez les cactées. Les travaux se font surtout sur les modèles expérimentaux que sont les genres *Arabidopsis*, *Torenia*, *Solanum*, *Nicotiana*... afin d'augmenter les rendements agronomiques.

Lorsqu'un grain de pollen se dépose sur un pistil c'est une longue aventure qui commence. Nous allons suivre ici tous les événements qui se produisent pour parvenir à la production d'une graine.

Le matériel génétique mâle n'a pas de motilité propre. Il va être entraîné dans le tube pollinique qui va germer depuis le grain de pollen et, tel une racine, va s'enfoncer et progresser dans les tissus de la fleur pour aller au contact de l'ovule. Ce tube, avant d'arriver à l'ovule, va interagir avec des types cellulaires différents dans sept tissus : le stigmate, le pistil, le placenta, le funiculus, le tégument, l'appareil filiforme et les synergides.

Au départ, le pollen contient deux noyaux aux fonctions bien différentes :

- **Le noyau végétatif** qui est le premier à s'engager dans le tube pollinique lors de la germination du grain de pollen aura pour rôle, tout au long de son périple, d'accumuler les matériaux nécessaires au développement du tube pour arriver au contact de l'ovule. Ensuite, ce noyau dégénérera.

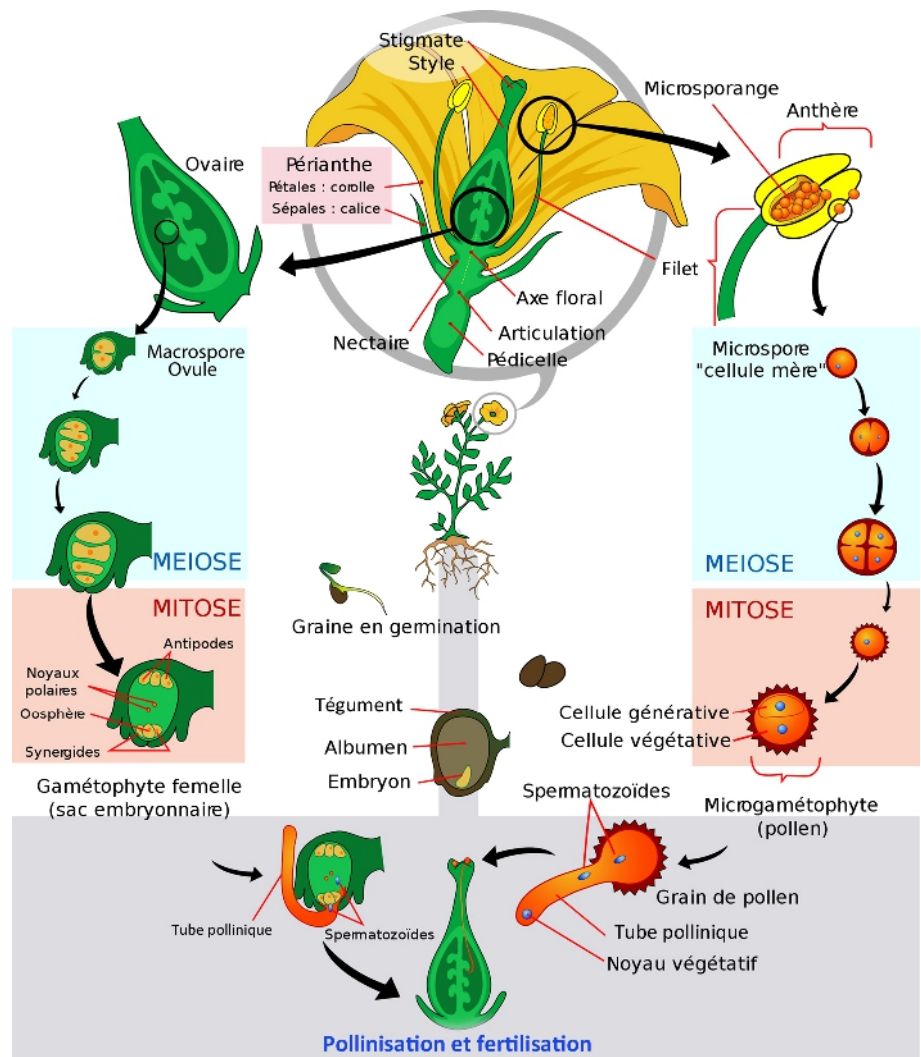
- **Le noyau génératif**, aussi appelé spermatogène, contient le matériel génétique. Il progressera de concert dans le tube pollinique et pendant son parcours il se scindera en deux noyaux spermatisques qui auront chacun leur rôle lors de la double fécondation de l'ovule.

Cycle des angiospermes.

Auteur : LadyofHats, Mariana Ruiz

Traducteur : Cehagenmerak

Licence Creative Commons



Déshydratation du pollen avant sa dissémination

Juste avant l'épanouissement de la fleur et l'ouverture des anthères, le grain de pollen perd un peu de sa teneur en eau. Cette déshydratation partielle le prépare au stress environnemental de sa dispersion et lui confère une quiescence momentanée.

Avant de libérer le pollen, l'anthère perd la couche cellulaire de son enveloppe interne (appelée tapetum)

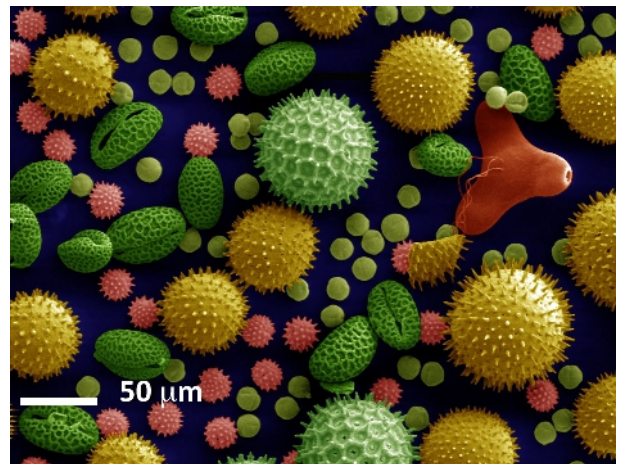
permettant la maturation des grains de pollen. Celle-ci se désagrége et ses éléments vont recouvrir la surface du grain de pollen lui procurant ainsi tous les éléments nécessaires à sa fixation et à sa germination ultérieures. La composition de ces éléments est hétérogène et inclut des cires, des microgouttelettes de lipides, des caroténoïdes, flavonoïdes, jasmonates, brassinostéroïdes et la plupart des autres phytohormones. C'est à ce stade que se dépose sur le grain de pollen une protéine appelée SCR/SP11 (S-locus Cystein-Rich protein) qui, par sa présence ou son absence, joue un rôle déterminant dans l'auto-stérilité.

Une autre protéine appelée oléosine GRP17 (Glycin Rich Protein), synthétisée dans les étamines et comportant une partie lipidique, interviendra dans la réhydratation du pollen.

Capture du grain de pollen par le stigmate

Au contact du stigmate, la couche des matériaux précédemment déposés à la surface du pollen se réhydrate. Cette couche devient fluide et s'écoule par gravité ou polarité vers le point de contact avec le stigmate. Le pollen subit alors une tension de surface et adhère aux papilles des stigmates. À la surface de ces papilles existe un récepteur qui lie la protéine SCR/SP11 présente à la surface du pollen. Le stigmate synthétise alors une glycoprotéine (SLG) qui augmente l'activité du récepteur. La fixation de cette protéine à son récepteur stigmatique déclenche une cascade d'événements biochimiques qui, déjà, conduit à l'acceptation ou au rejet du pollen.

Des pollens "étrangers" au genre peuvent ne pas se réhydrater sur le stigmate. L'absence de réhydratation du pollen altère grandement sa germination. C'est là un autre obstacle à franchir dans le cas d'hybridation intergénérique.



Pollens de quelques plantes courantes : Tournesol, Volubilis, Rose trémière (*Sidalcea malviflora*), lys (*Lilium auratum*), onagre (*Oenothera fruticosa*) et Ricin commun (*Ricinus communis*).

Auteurs : Louisa Howard, Charles Daghlain
Licence Creative Commons

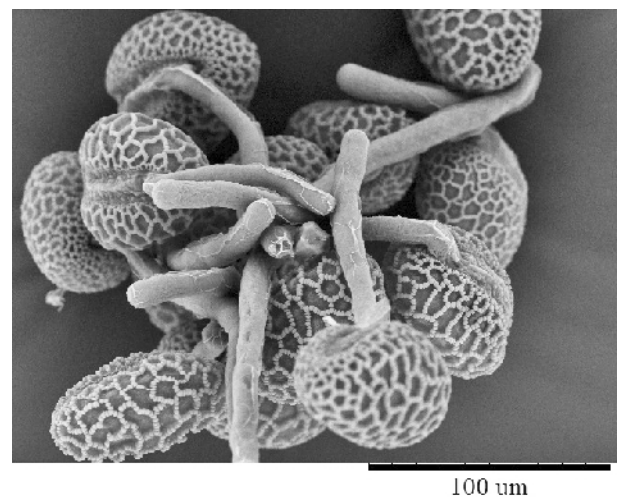
Germination du tube pollinique

C'est en 1824 que la germination du grain de pollen a été observée pour la première fois par l'italien Giovanni Battisti Amici grâce au microscope qu'il avait mis au point.

Le tube pollinique germe à la surface du stigmate. Il est alors dans le milieu d'adhésion aqueux qui présente un gradient de concentration en lipides, protéines, Ca^{2+} , etc... qui oriente sa croissance directionnelle vers le stigmate. Lorsque les stigmates sont dans une atmosphère trop humide, le gradient est perturbé et le pollen germe dans des directions aléatoires.

Une autre protéine SCR (S-locus Cystein-Rich protein) appelée LeSTIG, est synthétisée dans le stigmate et stimule la croissance du tube pollinique.

Le pollen de *Schlumbergera truncata* (Boyle, 1995) germe 30 à 40 minutes après le dépôt du pollen sur les stigmates, lesquels sont pénétrés 10 minutes plus tard.



Tubes polliniques en croissance sur pollen de lys.

Image : Plant Biology Research Institute, Montréal

Auteur : NeutrOnics

Licence Creative Commons

Cheminement dans le pistil

Le tube pollinique, en pénétrant dans le pistil, interagit avec la matrice interstitielle et sécrète des enzymes “digestives” qui lui permettent de se frayer un passage entre les cellules. Il se sert de ce matériau “digéré” comme nutriment pour construire, non seulement ses propres parois cellulaires, mais aussi d’autres constituants de ses cellules nécessaires à son allongement jusqu’à l’ovule. La pointe du tube pollinique est le lieu d’intenses réactions biochimiques impliquant des polysaccharides et des enzymes afin de lui assurer une progression rapide.

Le guidage du tube pollinique dans le pistil peut s’expliquer par un contrôle mécanique dû à l’architecture du tissu de parcours appelé tractus de transmission. Expérimentalement, des microbilles de latex ont pu être embarquées dans le pistil comme les tubes polliniques. Des microbilles de verre, pourtant inertes, n’ont pas suivi le même chemin. Ceci suggère l’influence d’une éventuelle charge électrostatique non encore élucidée.

Les hormones végétales telles que les auxines sont plus concentrées dans les parties parcourues par le tube pollinique. Elles pourraient participer à la germination puis à la croissance de celui-ci dans le pistil. Une nouvelle CRP (Cystein Rich Protein) appelée SCA (Stigma-style Cystein-rich Adhesin) est synthétisée le long du cheminement du tube pollinique pour se lier aux parois de ce dernier et favoriser son adhésion. Une autre protéine appelée AGP (ArabinoGalactan Protein) est indispensable à la croissance du tube pollinique, tout comme la présence d’ions calcium et potassium.

La vitesse de croissance du tube pollinique n’est pas uniforme. Chez *Schlumbergera truncata*, elle est d’abord lente (13 mm les douze premières heures) sur les deux premiers tiers du pistil et accélère ensuite jusqu’à atteindre 1,9 mm/heure dans les 12 à 18 heures qui suivent la pollinisation. Après 24 heures le tube pollinique atteint en moyenne 30 mm, soit 65% de la longueur du style.

Une mesure de la vitesse du tube pollinique sur *Echinopsis oxygona* et *E. eyriesii* à longues fleurs a été réalisée en 2012.

Toutes les fleurs sont fécondées le même jour avec le pollen frais d’un *Echinopsis sp* à fleur jaune, lequel féconde sans problème ces deux espèces. La longueur des pistils est mesurée en retranchant 15 mm de la longueur totale de la fleur depuis l’insertion de l’ovaire sur la côte jusqu’à la pointe des stigmates. Ces 15 mm correspondent à la longueur moyenne de l’ovaire ± 1 mm, mesurée lors d’une précédente floraison.

Les tubes floraux sont coupés n jours après la fécondation :

- *E. oxygona* : 1 – 2 – 3 – 4 – 5 – 7

- *E. eyriesii* : 1 – 2 – 3 – 5 – 7

Les tubes polliniques les plus rapides arrivent dans l’ovaire au bout de 3 jours seulement pour *E. eyriesii* et 4 jours pour *oxygona*. La vitesse de ces champions est de 2,7 mm/heure chez *E. eyriesii* et de 2 mm/heure chez *E. oxygona*.

La vitesse moyenne de cheminement du tube pollinique pour chacune de ces espèces semble se situer vers 1,6 mm/heure. Sur cette image de *Echinopsis eyriesii*, on aperçoit les trois fruits restant sur la plante à 3, 5, et 7 jours. Les autres, pollinisés à 1 et 2 jours, non fécondés, étant déjà tombés.

Vitesse du tube pollinique dans le pistil							
Echinopsis oxygona							
Jours après fécondation	1	2	3	4	5	6	7
n° de fleur	2	4	5	6	7		8
Nb de graines	0	0	0	55	515		399
Longueur du pistil, mm	195	193	205	190	190		200
Vitesse, mm/heure				2,0	1,6		1,2
Echinopsis eyriesii							
Jours après fécondation	1	2	3	4	5	6	7
n° de fleur	9	10	11		12		13
Nb de graines	0	0	82		877		1053
Longueur du pistil, mm	195	195	195		195		185
Vitesse, mm/heure			2,7		1,6		1,1



Influence de la maturité femelle

Kuboyama (1994) envisage que seuls les pistils immatures où toutes les molécules ne sont pas encore synthétisées peuvent laisser passer les tubes polliniques incompatibles (*Nicotiana rustica*/*Nicotiana tabacum*).

Il est intéressant de voir ce qu'il en est chez les cactus. j'ai choisi de procéder à des croisements intergénériques sur *Cleistocactus samaipatanus*.

Les fleurs arrivées à maturité par extériorisation du pistil font entre 38 et 40 mm. Le graphique ci-contre montre la croissance du tube floral. Le choix des longueurs pour une pollinisation correspondent à la maturité (40 mm), 36 heures avant (30 mm) 4 jours avant (20 mm) et 6 jours avant (15 mm).

La pollinisation se fait avec le même pollen et en même temps sur les fleurs aux différents stades choisis. Pour le stade à maturité, il suffit de déposer le pollen sur le pistil extériorisé.

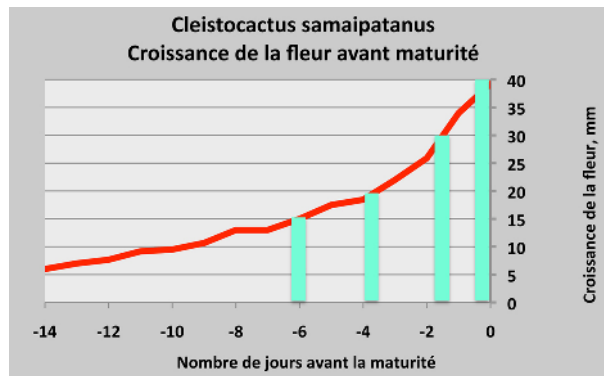
Pour les stades antérieurs, il faut choisir les fleurs selon leur longueur et, "chirurgicalement", exposer le pistil à l'air pour le polliniser. Deux plantes mères sont utilisées : ce sont des clones, l'une étant une bouture de l'autre.

Les pollens sont fournis par les genres *Echinopsis*, *Rebutia*, et *Matucana*, frais ou congelés de l'année.

Sur 26 hybridations intergénériques tentées, 12 ont réussi. La première surprise est de constater que la maturité du pistil ainsi que celle des gamètes femelles est antérieure de 36 heures, voire de 96 heures à l'anthèse pour six des fécondations.

Le nombre de graines récoltées selon l'espèce mâle est très hétérogène et les chiffres ne sont pas assez nombreux pour conclure à une influence du manque de maturité sur cette même donnée.

Enfin, dans le cas présenté ici, rien ne nous permet d'affirmer que des pistils immatures laissent passer des tubes polliniques incompatibles et permettent ainsi des croisements inhabituels. Il n'y eut aucune fécondation immature qui ne le fut aussi à maturité.



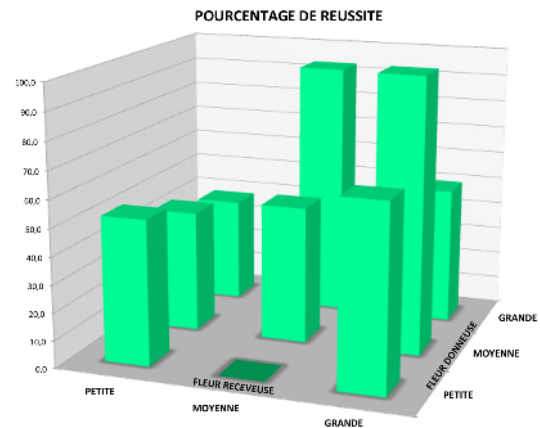
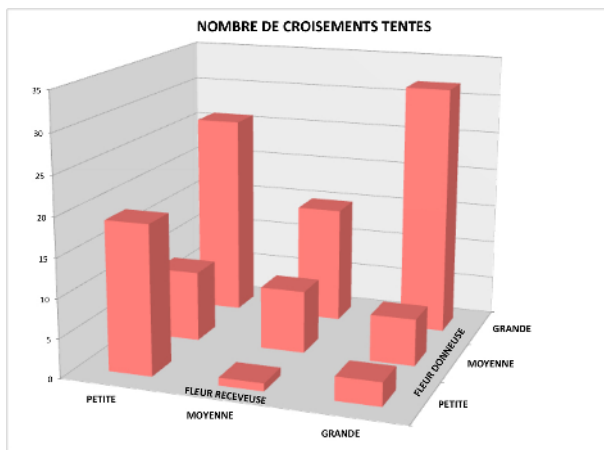
Influence de la longueur du pistil

Lee (2008) a montré, sur *Nicotiana*, que la longueur du pistil de l'espèce receveuse peut être une limite à la réussite d'une fécondation quand cette longueur est plus importante que le pistil de la plante donneuse.

Dans le genre *Echinopsis* (*sensu lato*), cela ne semble pas être le cas. Les résultats ci-dessous portent sur 119 tentatives de croisements en 2011. Les parents sont séparés en trois lots selon la longueur des fleurs :

- Petite, moins de 5 cm
- Moyenne, de 5 à 10 cm
- Grande, au-delà de 10 cm

Le peu de données pour certains lots limite les conclusions qu'on peut en tirer. Il y eut 66 réussites et 53 échecs. Le nombre de graines pour chaque fruit aurait peut-être été utile... Dans une prochaine étude, un protocole statistiquement plus équilibré pourrait aussi prendre en compte la compatibilité/proximité des différents taxons. Peut-être faudrait-il plutôt, comme l'a suggéré Alain Laroze, raisonner par couple (longue fleur/courte fleur) et chiffrer les croisements qui ne fonctionnent que dans un sens...



Guidage vers l'ovaire

S'il n'est pas arrêté, le tube pollinique continue à croître jusqu'à l'ovaire. À ce stade, les tubes polliniques qui, en cas d'incompatibilité présumée, n'auraient pas dû arriver jusqu'à l'ovaire rencontreront encore bien d'autres obstacles dans leur course. Dans le cas de genres différents, le tube peut quand même traverser tous les "filtres" et aller jusqu'à l'ovule. C'est le cas dans les croisements intergénériques sans pour autant présager de la viabilité des graines.

La pénétration à l'intérieur de l'ovaire se fait par un chemin prédéterminé dans le septum ovarien (paroi du placenta).

Le choix de l'ovule et le cheminement funiculaire

À un moment donné, le tube pollinique progressant dans la paroi de l'ovaire décide d'obliquer, parfois à plus de 90°, vers un ovule et de sortir du tissu du septum. Le mécanisme du choix n'est pas encore totalement établi mais le tube pollinique ne sort jamais dans la cavité ovarienne proche d'un ovule déjà fécondé. Il se peut que deux tubes sortent ensemble auprès d'un ovule non fécondé et se dirigent vers le micropyle en empruntant les côtés opposés du funiculus. Il y a donc une force de répulsion entre les tubes polliniques. Les tubes surnuméraires errent sans but dans la cavité ovarienne. L'émission d'oxyde nitrique par l'ovule fécondé pourrait être un signal chimique de répulsion des autres tubes polliniques.

L'émergence d'un tube pollinique semble être sous le contrôle des synergides : un ovule ayant gardé ses dernières et dont le sac embryonnaire a été neutralisé, attire quand même le tube pollinique.

Le signal des synergides pourrait aussi donner l'ordre au funiculus d'être réceptif au tube pollinique. Le mécanisme de guidage le long et dans le funiculus reste encore obscur.

L'attraction du micropyle

Le GABA (Gamma-Amino Butyric Acid) est un élément déterminant du guidage du tube pollinique vers l'ovule. La concentration maximale est atteinte aux environs du micropyle. C'est encore là un filtre à franchir car les niveaux de concentration tolérés par les tubes polliniques sont différents selon les espèces d'un même genre.

Une protéine appelée EA1, sécrétée dans le micropyle, a été identifiée comme signal attractif pour le tube pollinique.

Dernièrement, des polypeptides comme CRPs (Cystein Rich Polypeptide) et LUREs (acronyme orphelin), qui ont été identifiés comme dérivés des synergides, provoquent une attraction du tube pollinique à 100 ou 150 microns du micropyle.

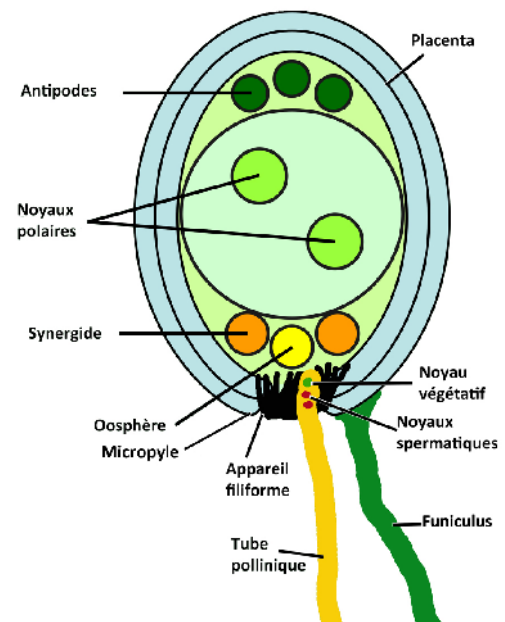
Un gène appelé CCG (Central Cell Guidance) joue aussi un rôle clé car, quand il n'est pas exprimé, le tube pollinique n'entre pas dans le micropyle.

L'appel des synergides

Le gène responsable de l'attraction du tube pollinique par les synergides est le MYB98 qui est responsable du développement de l'appareil filiforme dans la paroi proximale du micropyle. Cet appareil est, comme tous les maillons de la chaîne qui conduit à la fécondation, un élément nécessaire à la production du signal attractif vers le tube pollinique.

Une autre condition du succès - et non des moindres - est l'intégrité de l'ovule. Le défaut d'expression de la protéine membranaire GEX3 (Gamete EXpressed 3) chez l'ovule annule l'attraction du tube pollinique.

Enfin, un autre gène est impliqué dans la communication de proximité tube pollinique/ovule : AMC pour Abstinence par Consentement Mutuel. Ce gène, lorsqu'il n'est pas exprimé empêche la fécondation mais il suffit qu'il soit exprimé chez un seul des parents pour que la fécondation ait lieu. Il pourrait être le dernier responsable de l'auto-stérilité.



Ovule d'angiosperme lors de la fécondation

Auteur : Tameeria, Vector version : Lokal_Profil
Licence Creative Commons

Explosion et dissémination des deux noyaux spermatiques

Un récepteur aux protéines FER (pour *Feronia*) localisé dans la membrane des cellules synergides a été identifié. Il pourrait lier une molécule (Pollen Tube Ligand) produite par le tube pollinique qui induirait la dégradation de la synergide. En retour, la synergide produirait alors des enzymes qui provoqueraient l'éclatement du tube pollinique. Une déficience en récepteur FER pourrait être, là encore, une des causes d'auto-incompatibilité. Le tube pollinique pénètre une seule synergide sans que le critère de choix entre l'une ou l'autre ne soit pour l'instant connu. La tête du tube éclate immédiatement et libère les deux spermatozytes à 1,2 mm par seconde. La synergide, qui avait déjà commencé sa dégénérescence au moment du contact, la poursuit pour que l'un des spermatozytes fusionne avec l'oosphère afin d'engendrer un embryon diploïde pendant que l'autre va rejoindre les deux noyaux polaires déjà fusionnés pour former l'albumen triploïde qui sera la réserve nutritive de l'embryon, bien utile lors de la germination de la graine.

Conclusion

Le pollen prélevé délicatement sur un pinceau puis déposé amoureusement sur un pistil est le début d'une longue aventure... pas toujours tranquille, jusqu'à la graine.

Bibliographie

- Boyle T. H. *et al.*, 1995, J. Amer. Soc. Hort. Sci., 120 : 313-317
Cai G. *et al.*, 2013, Plants, 2 : 87-106
Chen D. and Zhao J., 2008, Physiologia Plantarum, 134 : 202-215
Crawford B. C. W. and Yanofsky M. F., 2008, Current Biology, 18 : R972-R978
Higashiyama T. and Hamamura Y., 2008, Sex Plant Reprod., 21 : 17-26
Higashiyama T., 2010, Plant & Cell Physiology, 51(2) : 177-189
Kuboyama T., Chung C. S. and Takeda G., 1994, Sex Plant Reprod., 7 : 250-258
Lee C. B. *et al.*, 2008, Sex Plant Reprod., 21 : 183-195
Mollet J-C. *et al.*, 2013, Plants, 2 : 107-147
Okuda S. *et al.*, 2009, Nature, 465 : 357-361
Onelli E., Moscatelli A., 2013, Plants, 2 : 211-229
Palanivelu R., Tsukamoto T., WIREs Dev Biol 2011. doi : 10.1002/wdev.6
Swanson R., Edlund A. F. and Preuss D., 2004, Annu. Rev. Genet., 38 : 793-218
Takeuchi H. and Higashiyama T., 2011, Current Opinion in Plant Biology, 14 : 614-621
Taylor L. P., 1997, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 48 : 461-491